TOYO INK GROUP

動物培養細胞用 ATP 標準試薬
取扱説明書

東洋ビーネット株式会社

2013.8.

Ⅰ． はじめに

ATP（アデノシン 5'-三リン酸）は、全ての動物、植物、微生物などの生命体に存在する物質です。ホタル由来のルシフェラーゼはATPのエネルギーを使ってルシフェリンを酸化し、光子を発するので、ATPの検出に使われています。この原理は食品衛生検査での微生物の検出に使われています。また、その濃度は生細胞数に比例するため、ATP の濃度を定量するアッセイは細胞障害、細胞増殖抑制あるいは細胞増殖効果の指標となるデータを提供します。

生物発光を検出する装置（ルミノメーター）は、装置により検出感度が異なるため、本製品を使用してのダイナミックレンジの確認、装置間差の補正などにご使用いただけます。

発光量から ATP 濃度を求めるため、検量線を作成する必要があります。「動物細胞用 ATP 標準試薬」は、ATP の濃度を正確に 1mM で調製した試薬であり、精度の高い検量線を作成していただけます。

本製品は、溶液で供給されるため凍結乾燥品よりも分解に対して安定です。

Ⅱ． 本製品の用途

●検出器（ルミノメーター）の直線性（リニアリティー）、ダイナミックレンジのチェック
●検出器・試薬の劣化の確認、機器間の感度差調整
●ATP 濃度と発光量（RLU 値）との相関に基づいた検量線作成

Ⅲ． 製品構成

製品名	メーカーコード	構成	保存条件
動物培養細胞用 ATP 標準試薬	AP-E103	1mM ATP 溶液 1 ml	20℃

Ⅳ． 「動物細胞培養用 ATP 標準試薬」の保存方法

1. 本製品は凍結品です。本試薬を受け取られた後は、ただちに-20℃で保存してください。
2. -20℃にて保存し、外箱に記載された使用期限内に使用してください。
3. 「ATP 標準試薬」は、3 回までの凍結／解凍が可能です。凍結／解凍を繰り返して使用される場合は、最初の解凍時に、「ATP 標準試薬」を必要量ずつ小分けにして、-20℃で保存し、凍結／解凍をできるだけ避けてください。

Ⅴ．「ATP 標準試薬」を使用したルミノメーターのキャリブレーション方法

生物発光は主にルミノメーターで測定します。ルミノメーターは検出器に光電子増倍管（フォトマルチプラー）を使用しており、バックグラウンドレベルや検出上限が装置によってバラツキが認められます。ここでは、「ATP 標準試薬」を使用したバックグラウンドの測定法および発光量検出上限を確認する方法をご紹介します。

A）バックグラウンドの検出

極微量の ATP を測定する場合、測定したサンプルの発光量からバックグラウンド RLU 値を差し引くことにより、正確な ATP 量を算出することが可能となる場合があります。バックグラウンド RLU 値は以下の操作より求めて下さい。

使用する試薬

●発光試薬（東洋ビーネット 『細胞の』ATP 測定試薬 CA10）
●細胞培養に用いている培地（血清を含んでいない）

使用する装置・器具

●ピペッター、マイクロチップ（滅菌済み）
●ラテックスグローブ
●96 ウェルプレート

注意事項

●環境に存在する菌や唾液などからの ATP のコンタミネーションを防止してください。
●実験操作では常にラテックスグローブを着用してください。
●試薬は全て常温に戻し、均等に混合してから使用してください。
●ATP 標準試薬と発光試薬の混合後は、速やかに測定してください。

操作

1. ウェルに細胞培養に用いている培地（血清を含んでいない）を 100 μl 入れます。
2. 発光試薬を 100 μl 加えて軽く撹拌し、ウェルプレートをルミノメーターにセットします。バックグラウンド RLU 値を測定します。

バックグラウンド RLU 値は「0」になりません。厳密に測定する場合は、サンプルを測定する直前に毎回バックグラウンド RLU 値を測定してください。

B）検出上限の確認

測定する ATP 量が過多の場合、発光活性が高くなり過ぎて RLU 値のリニアリティーが失われます。測定可能上限はルミノメーターの機種により異なります。あらかじめ検量線を作成し、リニアリティーが失われた ATP 濃度を算出します。

使用する試薬

●動物細胞培養用 ATP 標準試薬（本製品） 濃度 1mM（1×10^{-3}M）
●発光試薬（東洋ビーネット 『細胞の』ATP 測定試薬 CA10 等）
●細胞培養に用いている培地（血清を含んでいない）

使用する装置・器具

●ピペッター、マイクロチップ（滅菌済み）
●マイクロチューブ（滅菌済み）
●ラテックスグローブ
●96 ウェルプレート

注意事項

●環境に存在する菌や唾液などからの ATP のコンタミネーションを防止してください。
●実験操作では常にラテックスグローブを着用してください。
●試薬は全て常温に戻し、均等に混合してから使用してください。
●ATP 標準試薬と発光試薬の混合後は、速やかに測定してください。

操作

1. 動物培養細胞用 ATP 標準試薬を細胞培養に用いている培地（血清を含んでいない）で希釈し、ATP の段階希釈液を作製します。（1×10^{-4}M～1×10^{-10}M）
2. ウェルに ATP 段階希釈液を 100 μl 入れます。
3. 発光試薬を 100 μl 加えて撹拌します。プレートをルミノメーターに挿入し、発光量（RLU 値）を測定します。
   測定は ATP の濃度が低い方から行ってください。
4. RLU 値を記録して検量線を作成し、直線性が失われる ATP 濃度を記録します。

Ⅵ.「ATP 標準試薬」を使用した ATP 濃度と発光量に基づいた検量線の作成

使用する試薬
●動物細胞培養用 ATP 標準試薬(本製品)　濃度 1mM(1×10^{-3}M)
●発光試薬(東洋ビーネット 『細胞の』ATP 測定試薬 CA10 等)
●細胞培養に用いている培地(血清を含んでいない)

使用する装置・器具
●ピペッター、マイクロチップ(滅菌済み)
●マイクロチューブ(滅菌済み)
●ラテックスグローブ
●キュベット

注意事項
●環境に存在する菌や唾液などからの ATP のコンタミネーションを防止してください。
●実験操作では常にラテックスグローブを着用してください。
●試薬は全て常温に戻し、均等に混合してから使用してください。
●ATP 標準試薬と発光試薬の混合後は、速やかに測定してください。

操作
1. ATP 標準試薬を滅菌水で希釈し、ATP の段階希釈液を作製します。
   (1×10^{-4}M～1×10^{-10}M まで 10 倍希釈します。)
2. キュベットに段階希釈した ATP 標準試薬を 100 µl 入れます。
3. 発光試薬を 100 µl 加えて軽くタッピングしキュベットをルミノメーターに挿入し、発光量(RLU 値)を測定します。
   測定は低濃度から行ってください。
4. RLU 値を記録し検量線を作成します。

Ⅶ. ATP 測定製品

メーカーコード	製品名	製品構成	容量
TA100	『組織の』ATP 測定キット	1. ATP 抽出試薬・・・1 本 2. ATP 発光試薬・・・1 本 3. 発光試薬溶解液・・・1 本	100 回用
BA100	『血液の』ATP 測定キット	1. ATP 抽出試薬・・・1 本 2. ATP 発光試薬・・・1 本 3. 発光試薬溶解液・・・1 本 4. 血液希釈液・・・1 本	100 回用
CA10	『細胞の』ATP 測定試薬	1. 発光試薬・・・1 本	10 ml
CA50		1. 発光試薬・・・1 本	50 ml
CA100		1. ATP 発光試薬・・・2 本	50 ml x 2
CA1000		1. ATP 発光試薬・・・20 本	50 ml x 20

Ⅷ. 安全にお使い頂くために

●本製品を研究用途以外には使用しないでください。
●本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄ルールに従って処分してください。
●本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ず各々の使用説明書をよく読み、その指示に従って調整・準備を行ってください。
●本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌してください。
●材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合がありますので、試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄してください。

Ⅸ. 使用方法のご注意

●製品の安全性についてのご質問は、下記問い合わせ先にご連絡ください。(9:00～17:30)
●日本国内のみで使用してください。
●本製品を火気に近づけないでください。
●試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けてください。
●手袋、保護用メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けてください。万一、試薬類が目に入ったり、皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、ただちに医師の診断を受けてください。
●使用期限と保存条件を必ず守ってください。
●その他、ご不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。(9:00～17:30)

Ⅹ. 保証について

製造元では、本製品に不具合があった場合、代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な、もしくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任を負いません。

お問い合わせ先

東洋ビーネット(株)バイオプロダクツ部
〒104-0031 東京都中央区京橋 3-7-1
TEL:03-3272-1954　FAX03-3272-8276
E-mail: bio@toyo-b-net.co.jp
HP: http://www.toyo-b-net.co.jp/